ZUR KENNTNIS DER METHAEMOGLOBINBILDUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

ERNST GRAF, MED. PRACT.
VON SPEICHER (APPENZELL)

BASEL · BUCHDRUCKEREI WERNER-RIEHM · 1926

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt auf Antrag von Herrn Prof. Dr. med. et phil. K. Spiro.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Einleitung.

Die Gasbindung der roten Blutkörperchen, speziell ihre Sauerstoffbindung, ist noch in diesem Jahrhundert Gegenstand lebhaftester Diskussion gewesen. Es war bekanntlich Bohr, welcher den bis dahin geltenden Anschauungen entgegentrat, die wesentlich auf den quantitativen Arbeiten G. Hüfners basierten. Bohr glaubte, die allgemein akzeptierte, rein *physikalische* Auffassung durch eine andere ersetzen zu können, bei der außer dem Haemoglobin auch noch anderen Faktoren ein wesentlicher Einfluß auf die Sauerstoffbindung zugeschrieben wurde. In der Diskussion hierüber ist reiches Material beigebracht worden; die Bohrsche Auffassung wurde zunächst durch Versuche von Manchot, auch durch solche von Douglas und Haldane teilweise gestützt, sie ist dann aber durch entscheidende Versuche von Butterfield, Küster und Barcroft insofern widerlegt worden, als die tatsächlich nachweisbare Abweichung von den Hüfnerschen Kurven dadurch erklärt werden konnte, daß die Sauerstoff-Dissoziationskurve des Haemoglobins von gleichzeitig anwesenden Salzen stark abhängig ist. Das chemisch reine Haemoglobin zeigt eine konstante Lichtextinktion und ebenso konstante Gasbindungsverhältnisse, ist also ein auch physikalisch wohl charakterisiertes chemisches Individuum.

Während also die Beziehung Oxyhaemoglobin zu Haemoglobin damit exakt definiert werden konnte, gilt gleiches wohl nicht für die Beziehung *Oxyhaemoglobin zu Methaemoglobin.*

Seitdem Hoppe-Seyler im Jahre 1864 das *Methaemoglobin* entdeckt und genau beschrieben hat, hat sich eine kaum mehr übersehbare Reihe von Forschern mit dem Problem beschäftigt, was denn eigentlich das Methaemoglobin sei. Alle wohl überhaupt nur möglichen Formeln sind dafür aufgestellt worden; man hat ange-

nommen, daß es die gleiche elementare Zusammensetzung wie das Oxyhaemoglobin hat; A. Hüfner und andere Forscher haben angenommen, daß es nur die Hälfte, und namentlich hat neuerdings Conant Versuche beigebracht, nach denen es nur ein Viertel an Sauerstoff enthalte. Vor zwei Jahren hat W. Lipschitz, dem wir (in Gemeinschaft mit Weber) eine eingehende Studie über die Methaemoglobinbildung durch Hydroxylamin und dessen Derivate verdanken, die gesamte Literatur in den „Ergebnissen der Physiologie" eingehend und kritisch erörtert. Dort findet man auch den Hinweis auf die Arbeiten von Manchot und H. Fischer, welche beide im Haemoglobin dreiwertiges Eisen annehmen. Haurowitz hat in neuester Zeit angenommen, daß das Methaemoglobin ein Keton darstelle, das mit seiner Enolformel in Gleichgewicht steht. W. Heubner hat mit seinen Schülern wesentlich den Mechanismus der Haemoglobinbildung, das Gleichgewicht der verschiedenen Oxydationsstufen, die Beteilung des Luftsauerstoffs, die katalytische Wirksamkeit des Haemoglobins untersucht und besonders klar gezeigt, daß Methaemoglobin entsteht nicht nur durch oxydierende Stoffe, sondern auch durch solche reduzierende Stoffe, die intermediär, im Sinne der bekannten Englerschen Auffassung, durch Sauerstoffaufnahme zu oxydierenden Stoffen werden. Komplizierter liegen offenbar die Verhältnisse beim Hydroxylamin, das, wie Lipschitz-Weber und Roche gezeigt haben, zwar Methaemoglobin bildet, aus dem aber dabei außer Ammoniak auch Stickstoff und Nitrate entstehen; dies können wir bestätigen, fanden aber eine starke Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Mit einer Reihe von Mitarbeitern hat neuerdings Nicloux den Sauerstoffgehalt des Methaemoglobins bestimmt und in Übereinstimmung mit den vor drei Jahren erschienenen Arbeiten von Quagliariello, wie mir scheint, wohl sicher nachgewiesen, daß im Methaemoglobin nur die halbe Menge Sauerstoff gegenüber dem Oxyhaemoglobin vorhanden ist. Das heißt, während v. Rheinbold formulierte:

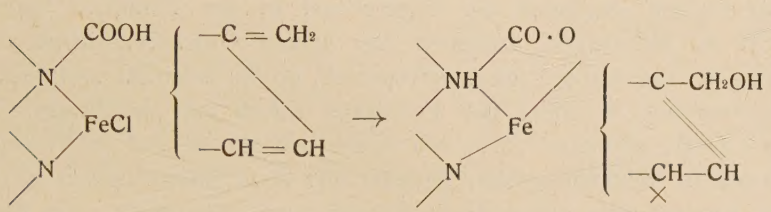
$$HbO_2 + K_3FeCy_6 + H_2O = Hb \cdot OH + K_3HFeCy_6 + O_2$$

schreibt Nicloux wohl mit Recht:

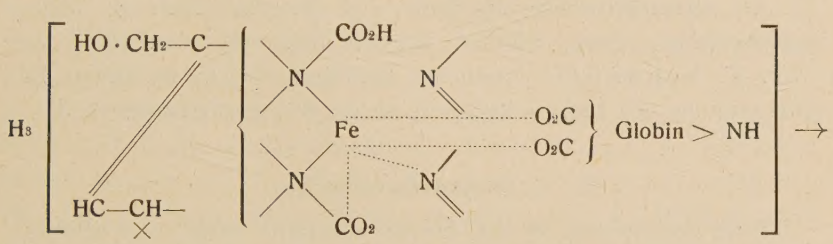
$$HbO_2 + 2\,K_3FeCy_6 + K_2O = Hb \cdot O + 2\,K_4FeCy_6 + O_2$$
$$Hb + 2\,K_3FeCy_6 + K_2O = Hb \cdot O + 2\,K_4FeCy_6$$

V. Balthasard und M. Philippe haben das vollkommen bestätigt.

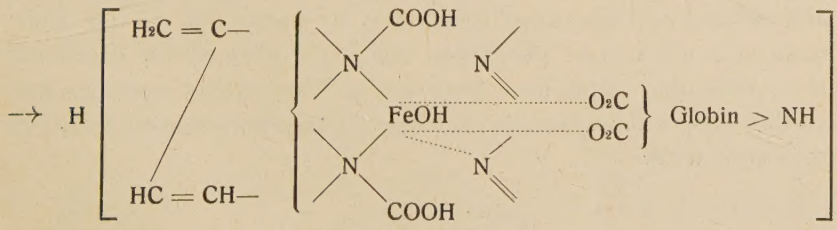
Über die Unterschiede in der Konstitution von Haemoglobin und Methaemoglobin hat kürzlich W. Küster ganz spezielle Anschauungen geäußert, die auf folgender Beobachtung beruhen. Eine Lösung von Haemin, also dem Abkömmling des Methaemoglobins, verwandelt sich unter dem Einfluß von Alkali bei Luftabschluß in Haemochromogen, bekanntlich ein Abkömmling des Haemoglobins. Küster nimmt an, daß das unter dem Einfluß der Lauge am Eisen gebildete Hydroxyl vom Eisen abwandert an eine reaktionsfähige Stelle im Haeminmolekül und auf diesem Wege ein Radikal erzeugt. Er drückt das durch folgende Formeln aus:



und gibt dementsprechend dem Haemoglobin und dem Methaemoglobin die nachfolgenden Formeln:



Haemoglobin



Methaemoglobin.

Dieses sind wohl die speziellsten Vorstellungen, welche bisher über das Verhältnis vom Haemoglobin zum Methaemoglobin gemacht sind. Auch ihnen liegt die Annahme zugrunde, daß in dem

als Sauerstoffüberträger funktionierenden Haemoglobin eine Ferroverbindung vorliegt, während in dem hierzu nicht geeigneten Methaemoglobin die Ferristufe enthalten sein soll.

Eigene Untersuchungen.

I.

Den nachfolgenden Untersuchungen, welche in der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt wurden, lag die Absicht zugrunde, an bestimmten Modellen zu untersuchen, inwieweit ein Unterschied in der Fähigkeit Sauerstoff zu übertragen, zwischen den beiden *Oxydationsstufen des Eisens* vorhanden sei, und zwar speziell, ob die bekannte sauerstoffübertragende Wirkung der Ferrosalze durch die Gegenwart solcher Stoffe gehemmt wird, von denen bekannt ist, daß sie Haemoglobin in Methaemoglobin umwandeln; denn physiologisch ist ja der wesentlichste Unterschied zwischen Oxyhaemoglobin und Methaemoglobin der, daß ersteres als Sauerstoffüberträger dienen kann, letzteres aber nicht.

Als charakteristische Reaktion, bei der das Eisen als Sauerstoffüberträger dient, wählten wir die bekannte, namentlich von Chr. F. Schönbein studierte Reaktion der katalytischen Beschleunigung der Indigooxydation durch Wasserstoffsuperoxyd.

1. Versuchsreihe*).

Eine Verbindung, welche Oxyhaemoglobin leicht in Methaemoglobin überführt, ist das Permanganat. Läßt man dementsprechend Kaliumpermanganat auf die Mischung von Indigoblau, Ferrosulfat und Wasserstoffsuperoxyd einwirken, so bleibt die, in der Kontrollprobe erkennbare Oxydation aus. Der Versuch ist allerdings nicht eindeutig, denn man kann gegen ihn geltend machen, daß hierbei das Kaliumpermanganat durch das Wasserstoffsuperoxyd reduziert wird.

2. Versuchsreihe.

Versetzt man Indigolösung mit Wasserstoffsuperoxyd und Ferrocyankalium, so tritt Entfärbung sehr bald ein; setzt man

*) Der Raumersparnis halber gebe ich in den einzelnen Versuchsreihen nur die wichtigsten Resultate bezw. Kontrollversuche wieder.

Kaliumchlorat hinzu, so tritt auch Entfärbung ein, vielleicht etwas langsamer, entsprechend dem Umstand, daß ja auch das Kaliumchlorat nur in vivo Methaemoglobin bildet, aber nicht in vitro. Eine Einwirkung des Ferrocyankaliums selbst auf das Ferrosulfat war nicht zu konstatieren; jedenfalls kann das Kaliumchlorat auch nicht das Ferrocyankalium in die wirksame Ferristufe überführen, wie besondere Versuche ergaben, das heißt, es werden auch komplexe Ferroverbindungen nicht in ihre wirksame Ferristufe durch Chlorat übergeführt.

3. Versuchsreihe.

Bei einem Versuche mit Nitrit zeigte sich ebenfalls eine deutliche Verlangsamung, die aber wohl auch (wie in der ersten Versuchsreihe) auf eine Reduktion des Wasserstoffsuperoxyd durch das Nitrit zu beziehen ist, obgleich in beiden Fällen ein erheblicher Überschuß von Wasserstoffsuperoxyd vorhanden war.

4. Versuchsreihe.

Um so interessanter verlaufen die Versuche mit Hydroxylamin. Haber hat bekanntlich gezeigt, daß in *saurer* Lösung Eisenoxydlösung durch Hydroxylamin *reduziert* wird, während in *alkalischer* Lösung Eisenoxydul durch dasselbe *oxydiert* wird, das heißt, in der alkalischen Lösung kann es neben seiner bekannten Formel I, $H_2N \cdot OH$ noch in der tautomeren Form II $H_3N : O$ existieren. Durch die Formel II erklären sich ebenso leicht seine oxydativen, wie durch I seine reduzierenden Eigenschaften. Vortrefflich stimmen unsere Erfahrungen über die Methaemoglobinbildung mit diesen *Haber*schen Versuchen überein. Jedenfalls geht die Methaemoglobinbildung durch Hydroxylamin in saurer Lösung erheblich schneller vor sich als in alkalischer.

I.	Blut + H_2O	hellrot.
II.	» + salzsaur. Hydroxylamin + H_2O . . .	rauchbraun (starke Methaemoglobinbildung).
III.	» + » » + NH_3 . . .	braunrot.
IV.	» + » » + Natr. acetat	rot mit Stich ins Braune.

Aber auch die Einwirkung des Hydroxylamins auf das Schönbeinsche Gemisch, wie wir kurz die Mischung von Indigoblau, Ferrosulfat und Wasserstoffsuperoxyd nennen wollen, wechselt je nach der Reaktion stark. Verwendet man das *salzsaure* Salz, so wird die Reaktion stark *beschleunigt,* arbeitet man aber in *ammo-*

niakalischer Lösung, oder bei Gegenwart von Natronlauge, oder noch besser bei Gegenwart von Natriumacetat, so wird die Reaktion *verzögert*, oder sogar gehemmt. Diese Versuche zeigen wohl eindeutig, daß die Ferrostufe die für die Sauerstoffübertragung geeignetere ist als die Ferristufe, und die Analogie mit den Verhältnissen beim Blutfarbstoff ist evident.

5. Versuchsreihe.

Bekanntlich ist das *Brenzkatechin* ein guter Methaemoglobinbildner; seine Verwendung für die vorliegenden Zwecke gestaltete sich aber deshalb schwierig, weil das Brenzkatechin durch Ferrosulfat selbst schon schwach grünlich-blau gefärbt wird, offenbar, infolge gleichzeitig entstehenden Ferrisalzes, das ja mit dem Brenzkatechin die bekannte Eisenreaktion gibt, die zur Entdeckung der wirksamen Substanz der Nebennierenrinde führte. Wir konnten uns aber von der Tatsache, daß Ferroverbindungen durch Brenzkatechin in Ferriverbindungen übergeführt werden durch folgenden Versuch überzeugen: Eine Lösung von Ferrocyankali mit Brenzkatechin ist schön gelb, versetzt man sie aber mit einer Spur Ferrosulfat, so entsteht alsbald der typische tiefblaue Niederschlag von Berlinerblau. Derselbe Versuch gelingt noch besser, wenn man in folgender Art verfährt: Man versetzt eine Lösung von verdünntem Ferrosulfat allein mit einem Tropfen Ferrocyankalium und fügt einen Tropfen Brenzkatechin dazu. Die vorher hellblaue Lösung färbte sich sofort tief dunkelblau. Auch eine Mischung von Mohrschem Salz und Ferrocyankalium wird auf Zusatz weniger Tropfen *Pyrogallol* sofort tief dunkelblau gefärbt; es wird also auch hier die sonst beständige Ferrostufe zur Ferristufe oxydiert.

6. Versuchsreihe.

Wenn die vorgetragene Anschauung richtig ist, daß der Übergang von Haemoglobin, bezw. Oxyhaemoglobin in Methaemoglobin den Übergang der *Ferrostufe in die Ferristufe* bedeutet, dann war zu erwarten, daß umgekehrt solche Stoffe, welche Methaemoglobin in Haemoglobin verwandeln, auch imstande sein müssen, die *Ferristufe in die Ferrostufe* zu verwandeln; ein solches Mittel hat neulich K. Sakurai im Thiosulfat kennen gelehrt. Nun ist es ja an und für sich schon bekannt, daß Ferriverbindungen

durch Thiosulfat reduziert werden, indem sich dabei Tetrathionat bildet; es war nur die Frage, ob auch komplex gebundenes Eisen in derselben Weise reduziert wird. Das läßt sich in der Tat gut demonstrieren am Ferricyankalium, dessen gelbe Farbe durch Natriumthiosulfat in eine blaue umgewandelt wird, später tritt Entfärbung ein, das heißt, zunächst entsteht intermediär Ferriferrocyanid, das dann weiter zu dem farblosen Ferro-ferrocyanid reduziert wird. Auch gelang es in der Tat, rein hergestelltes Berlinerblau, das heißt, die Ferriverbindung der Ferrocyanwasserstoffsäure in die Ferroverbindung zu reduzieren. Ähnlich gelang die Reduktion der komplexen Weinsäureverbindungen.

Da ja bei manchen Tierarten das *Kupfer* an Stelle des Eisens als Sauerstoffüberträger dient, haben wir endlich auch ammoniakalische Cuprisalzlösung, in der also das komplexe Cupriammoniak vorliegt, mit Natriumthiosulfat zu reduzieren versucht. Auch das gelang ohne weiteres, indem die Lösung entfärbt wurde und später schwarzes Cuprosulfid zur Ausscheidung kam. Man sieht daran deutlich die starke Affinität des Thiosulfates zu den Metallen, die J. Markwalder in einer Arbeit aus unserem Institut erst kürzlich auch für das Arsen nachgewiesen hat.

II.

Die im ersten Abschnitt dargelegten Versuche stehen also vollkommen mit der Auffassung im Einklang, und sind eine Stütze für sie, daß die Methaemoglobinbildung durch Ferricyankalium auf einer *Oxydation des zweiwertigen in das dreiwertige Eisen* beruht. Nun ist ja gerade das Ferricyankalium ausgezeichnet dadurch, daß es ein starkes Oxydationsmittel ist, das zum Beispiel auch mit Wasserstoffsuperoxyd, worauf wir noch weiter unten zu sprechen kommen, seinen Sauerstoff abgibt. Gerade diese Tatsache, daß es Superoxyde zersetzt, ist ja für die Deutung der Zerstörung des Oxyhaemoglobins heranzuziehen, denn das Oxyhaemoglobin ist ja selbst ein solches Superoxyd, während das (reduzierte) Haemoglobin im Sinne von W. Küster eine ungesättigte Verbindung darstellt im Gegensatz zum Oxyd, das eben im Methaemoglobin vorliegt. Es war daher von Interesse, *solche komplexe Ferrisalze* bezüglich ihrer Einwirkung auf das Haemoglobin zu untersuchen, welche labiler sind als das Cyanid. Ein solches komplexes Ferrisalz liegt in dem *Natriumferricitrat* vor. Die Versuche hierüber sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

7. Versuchsreihe.

Methaemoglobinbildung durch Ferricitrat.

Lösungen: m/6 Ferricitrat; m/10 Natriumcitrat; Blutlösung 1 : 2 H_2O.

1.	0,1 ccm Fe···	+ H_2O ad 1 ccm + 1 ccm Citrat	+ 1 ccm Blut	hellrote Lösung.
2.	0,2 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	» »
3.	0,4 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	dunkelrotbraune Lösung.
4.	0,8 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	dicker Eiweißniederschlag.
5.	1,0 » »	+ 0,5 H_2O + 0,5 ccm K_3FeCy_6 + 1 ccm Citrat	+ 1 » »	Braunfärbung.
6.	0,5 m/10K_3FeCy_6	+ 1,5 »	+ 1 » »	»
7.		2 ccm H_2O	+ 1 » »	hellrote Lösung.
8.	0,4 ccm Fe···	+ H_2O ad 1 ccm + 1 ccm Citrat	+ 1 » »	rotbraune Lösung.
9.	0,5 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	trübe braune Lösung.
10.	0,6 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	starker gelblich-brauner Niederschlag von Eiweiß.
11.	0,7 » »	+ » » 1 » + 1 » »	+ 1 » »	starker gelblich-brauner Niederschlag von Eiweiß.
12.	0,4 » »	+ » » 1 » + 2 » »	+ 1 » »	hellrote Lösung.
13.	0,5 » »	+ » » 1 » + 2 » »	+ 1 » »	» »
14.	0,6 » »	+ » » 1 » + 2 » »	+ 1 » »	Rote Lösung mit Stich ins Braune.
15.	0,7 » »	+ » » 1 » + 2 » »	+ 1 » »	braunrote Lösung.
16.	0,8 » »	+ » » 1 » + 2 » »	+ 1 » »	trübe braune Lösung.
17.	0,4 » »	+ » » 2 » + 0,0 » »	+ 1 » »	
18.	0,5 » »	+ » » 2 » + 0,0 » »	+ 1 » »	Braune Lösungen wie 5 und 6.
19.	0,6 » »	+ » » 2 » + 0,0 » »	+ 1 » »	
19.*	1 » »	+ 1 ccm H_2O + 0,0 » »	+ 1 » »	braune Lösung.
19.**	0,0 » »	+ 1 » » + 1 » »	+ 1 » »	hellrote Lösung.
20.	0,4 » »	+ ad 2 ccm H_2O + 1 » »	+ 1 » »	rote Lösung.
21.	0,5 » »	+ » 2 » » + 1 » »	+ 1 » »	braune stark trübe Lösung.
22.	0,6 » »	+ » 2 » » + 1 » »	+ 1 » »	starke Eiweißfällung.

Nach 2 Stunden sind 3, 8 und 9 gegen die Standardprobe 7 deutlich braun gefärbt.

Aus dem Protokoll ergibt sich zunächst als physiologisch-chemisch interessanter Nebenbefund, daß Ferrichlorid in den hier angewendeten Konzentrationen nicht fällend auf das Serumeiweiß wirkt, desgleichen auch Natriumcitrat für sich. Dagegen wirken Fe''' und Citrat zusammen fällend in einem gewissen Konzentrationsverhältnis. Wie die nach einem Tage aufgenommenen Befunde zeigten, begann die Eiweißfällung bei Gegenwart von 1 ccm m/10 Citrat bei 0,4 ccm $FeCl_3$; dagegen bei Gegenwart von 2 ccm Citrat erst bei 0,7 ccm $FeCl_3$. Nun reicht 1 ccm m/10 Citrat gerade aus, um mit 0,3 ccm m/10 Fe''', 2 ccm m/10 Citrat um mit 0,6 ccm m/10 Ferrisalz ein komplexes Citrat von der Form $Na_3FeCitrat_2$ zu geben. (In den obigen Versuchen sind aber erheblich höhere Fe'''-Konzentrationen zur Anwendung gekommen, indem wir von m/6 Lösungen ausgingen.) Es scheint demnach, daß das Komplexsalz nicht eiweißfällend wirkt, dagegen das Ferricitrat. Letzteres tritt damit in Analogie zum Ferriacetat, dessen eiweißfällende Wirkung ja schon F. Hofmeister in seinen grundlegenden Arbeiten festgestellt hat.

Der Befund ca. 16 Stunden nach Ansetzen der Versuche und die spektroskopische Untersuchung nach einem Tage ergaben folgendes:

1.	Dunkelrote Lösung	Haemoglobinstreifen.
2.	» »	»
3.	Braune Lösung, Spur Eiweiß . . .	Methaemoglobin, dann Haemoglobin.
4.	Starke Eiweißfällung, überstehende Flüssigkeit gelb	—
5.	Rehbraune Lösung	Methaemoglobin.
6.	» »	»
7.	Rote Lösung	Methaemoglobin, dann Haemoglobin.
8.	Braune Lösung, ganz wenig Eiweiß	» » »
9.	» » 1/4 Eiweiß	Methaemoglobin, langsam Haemogl.
10.	Hellgelbe Lösung, 1/2 Eiweiß . . .	—
11.	Starke Eiweißfällung	—
12.	Rotbraune Lösung	Methaemoglobin u. Oxyhaemoglobin.
13.	» »	Methaemoglobin.
14.	Braune Lösung, Spur Eiweiß . . .	»
15.	» » ganz wenig Eiweiß .	Methaemoglobinbildung.
16.	» » 1/6 Eiweiß	»
17.	» » gegen Lakmus sauer	Haematinbildung.
18.	» »	»
19.	» »	»
20.	» » wenig Eiweiß . . .	Methaemoglobin.
21.	» » 1/5 Eiweiß	»
22.	Hellgelbe Lösung, 1/2 Eiweiß . . .	—

Die Lösungen 8 und 15—18 sind auch nach drei Stunden spektroskopisch untersucht worden:

8. Methaemoglobin und Oxyhaemoglobin.
15. Methaemoglobin schwach und Oxyhaemoglobin stark.
16. » deutlich » » schwach.
17. Haematin.
18. »

Hieraus geht hervor, daß nach einigen Stunden noch Oxyhaemoglobin neben Methaemoglobin vorhanden ist. Der Ferricitratkomplex vermag also zwar als Methaemoglobinbildner zu wirken, *doch vollzieht sich die Reaktion nur sehr langsam.*

Die Beobachtung, daß das Methaemoglobin, das durch Ferricitrat gebildet wurde, bei der Belichtung mit der Bogenlampe in Haemoglobin übergeht, ist damit zu erklären, daß das bei der Oxydation des Blutfarbstoffes entstehende *Ferrocitrat reduzierend auf Methaemoglobin* wirkt, wie uns besonders zu diesem Zweck angestellte Versuche lehrten. Die Haematinwirkung von $FeCl_3$ ist auf dessen Hydrolyse zurückzuführen.

8. Versuchsreihe.

Grenze der Methaemoglobinbildung durch K_3FeCy_6.

M = Methaemoglobinbildung, O = Oxyhaemoglobinbildung.
Spektroskopische Untersuchungsergebnisse nach 1 Stunde.

Lösungen: m/100 K_3FeCy_6, Blut 1 : 2 H_2O.

1. 0,2 ccm K^3FeCy_6 + ad 2 ccm H_2O + 1 ccm Blut	M stark, Streifen in AE 6481—6133. O nur ganz schwach, Str. in AE 589-567.
2. 0,1 » » + » 2 » » + 1 » »	M deutl. Str. in AE 647—1163. O deutl. 556—524.
3. 0,05 » » + » 2 » » + 1 » »	M *ganz* schwach 64—61. O sehr stark 546—566, 557—520.
4. 0 » » + » 2 » » + 1 » »	M = 0. O Str. in AE 561—564 u. 557-5208.

Lösung: m/100 K_3FeCy_6.

5. 0,4 ccm K_3FeCy_6 + ad 2 ccm H_2O + 1 ccm Blut	M ganz schwache Andeutung. O scharf 5892—5642, 556—5214.
6. 0,6 » » + » 2 » » + 1 » »	M schwach 6452—616. O ordentl. 588—5652, 5556—5208.
7. 0,8 » » + » 2 » » + 1 » »	M deutlich 6435—615. O ordentl. 587—5678, 5545—5215.
8. 1 » » + » 2 » » + 1 » »	M scharf 6438—6162. O schwächer 588—5679, 5522—526.

Die bei gleicher Schichtdicke, wie bei den Citratversuchen festgesetzte Grenze der Methaemoglobinbildung durch K_3FeCy_6 liegt also bei 0,5 ccm m/1000 K_3FeCy_6 auf 3 ccm Flüssigkeit, das ist bei einer Konzentration von m/6000 Fe. Die Grenze der Methaemoglobinbildung durch Ferricitrat liegt bei 0,3 ccm m/6 $FeCl_3$ auf 3 ccm Lösung, d. i. bei m/60 Fe. *Das K_3FeCy_6 wirkt also 100 mal stärker als das komplexe Ferricitrat.* Die Methaemoglobinstreifen waren auch einen Tag, nachdem das nicht angegriffene Oxyhaemoglobin in Haemoglobin übergegangen war, noch vorhanden.

9. Versuchsreihe.

Ist die Haemoglobinbildung von $Fe^{\cdot\cdot}$ + Citrat aus Blut dem einfachen Eisencitrat oder dem Komplexsalz zuzuschreiben?

H = Haemoglobinbildung, O = Oxyhaemoglobinbildung,
Lösungen: m/10 Ferrosulfat, m/10 Nacitrat, Blut 1:2 H_2O.

1.	0,5 ccm $Fe^{\cdot\cdot}$	+ 0,3 Citrat	+ ad 2 H_2O	+ 1 ccm Blut	sofort H, kirschrot.
2.	0,5 » »	+ 0,5 »	+ » »	+ 1 » »	» » »
3.	0,5 » »	+ 1 »	+ » »	+ 1 » »	sof. H, Str. in AE 5968-5250.
4.	0,05 » »		+ » »	+ 1 » »	O rot, » » » 5948-5169.
5.	0,5 » »	+ 0,05 »	+ » »	+ 1 » »	schw. kirschrot, schw. H, 5972—5210.

Wie spektroskopisch ermittelt wurde, tritt auch bei 4, wo $Fe^{\cdot\cdot}$ ohne Citrat vorhanden ist, langsam Haemoglobinbildung ein, doch ist zwischen 4 und 5 in der Färbung ein deutlicher Unterschied, 5 ist mehr kirschrot. Demnach tritt noch bei 10 fachem Fe-Überschuß die Haemoglobinbildung deutlich hervor, also bei Mengenverhältnissen, bei denen die Bildung eines komplexen NaFe-$Citrat_2$ nicht anzunehmen ist.

Um die schwache Haemoglobinbildung durch Ferrosulfat möglichst auszuschalten, wurde noch folgende Reihe mit verdünnteren Lösungen untersucht: m/100 $Fe^{\cdot\cdot}$ und m/100 Natriumcitrat.

1.	1 ccm $Fe^{\cdot\cdot}$	+ 0 Citrat	+ 1 ccm H_2O		hellrot wie Standard-Blut, Str. in $\mu\mu$ 596—516, schwache Aufhellung 560—550.
2.	1 » »	+ 0,5 ccm »	+ 0,5 »	»	hellrot mit schwach violetter Tönung 595—528, schwache Aufhellung 566—554.
3.	1 » »	+ 1 » »	+ 0	»	schwach kirschrot 594—524, schwache Aufhellung.
4.	1 » »	+ 2 » »	+ 0	»	kirschrot 594—528, keine Aufhellung.

5. 1 ccm $Fe^{\cdot\cdot}$ + 0,5 ccm Citrat + 1,5 ccm H_2O hellrot 592—523, ganz schwache Aufhellung.
6. 1 » » + 1 » » + 1 » » kirschrot 591—529, keine Aufhellung.
7. 1 » » + 2 » » + 0 » » kirschrot 5925—7275, keine Aufhellung.

Die spektroskopische Untersuchung liefert hier ein weniger gutes Erkennungsmittel des Haemoglobin-Oxyhaemoglobinverhältnisses als die Differenz der Farbtöne, da die Oxyhaemoglobin- und Haemoglobininspektren sich überdecken und einen breiten Streifen bilden. Es geht auch aus obiger Reihe hervor, daß die kirschrote Farbentönung des Haemoglobins schon auftritt, bevor nach den Mengenverhältnissen eine Komplexbildung zu erwarten ist.

Das komplexe Ferrosalz wirkt aber stärker reduzierend, als die freien Ferro-ionen. Natriumcitrat beschleunigt die Methaemoglobinbildung durch $NaNO_2$, versetzt man aber Ferrosalz mit Natriumcitrat und Blut, so tritt zunächst kirschrote Färbung ein durch Bildung von reduziertem Haemoglobin. Bei Zusatz von $NaNO_2$ geht die kirschrote Färbung in hellrot über, dunkelt dann nach und wird braunrot, unterscheidet sich aber deutlich von der rotbraunen Färbung der Ferricitratfreien Vergleichsprobe.

Da die Methaemoglobinbildung über die Vorstufe des Oxyhaemoglobins verläuft und das Oxyhaemoglobin leicht durch Ferrocitrat reduziert wird, so fehlt es eben in diesen Versuchen an der für die Methaemoglobinbildung zunächst erforderlichen Vorstufe. Erst langsam wird durch das zugesetzte Natriumnitrit, das sonst zur Methaemoglobinbildung direkt dient, wieder die Oxydationsstufe erreicht, aus der das Methaemoglobin sich bilden kann. *Der Farbenumschlag kann als direkter Beweis dafür angesehen werden, daß das Methaemoglobin sich erst aus dem Oxyhaemoglobin bildete und nicht aus dem reduzierten Haemoglobin.*

III.

In Übereinstimmung mit einer namentlich in der letzten Zeit vielfach geäußerten Anschauung sind wir also zu der Überzeugung gekommen, daß die Methaemoglobinbildung auf einer Oxydation beruht, bei der entweder eine direkte Oxydation durch das zugesetzte Agens stattfindet, oder eine indirekte, indem reduzierende Stoffe, dadurch, daß sie selbst Sauerstoff aufnehmen im Sinne von Engler die Oxydation einleiten. Zu diesen Stoffen

letzterer Art gehört z. B. das als Methaemoglobinbildner so besonders geeignete Natriumnitrit.

Wir haben daher, um diese Vorstellung noch weiter zu stützen, weitere Versuche gemacht *über den Einfluß der Methaemoglobinbildner* auf eine andere Reaktion des Haemoglobin, nämlich *auf die Benzidinreaktion.* Die Analogie ist in der Tat auffallend. Die direkt oxydierenden Methaemoglobin-bildenden Stoffe geben auch direkte Benzidinreaktion, die indirekten erst nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd. Bei den direkt oxydierenden kann sogar ein Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd hemmend wirken, indem sie durch das Wasserstoffsuperoxyd reduziert werden.

I. $AO + HbO_2 = A + HbO + O_2$.
II. $A + HbO_2 + 2\,H_2O_2 = AO + HbO + O_2 + 2\,H_2O$.
III. $AO + H_2O_2 = A + O_2 + H_2O$.

Ferricyankalium gibt direkt mit Benzidin schöne Blaufärbung, während Nitrit erst auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd die Reaktion hervorruft. Die indirekten (in vivo) Methaemoglobinbildner, wie Kaliumchlorat geben natürlich auch keine Benzidinreaktion. Besonders interessant sind die Verhältnisse beim Hydroxylamin. Dieses liefert ja, wie oben nachgewiesen wurde, in salzsaurer Lösung Methaemoglobin, während die Oxydation des Benzidin zum Benzidinblau in salzsaurer Lösung überhaupt nicht vor sich geht.

Ferrocyankalium gibt bei der Benzidinprobe bei Wasserstoffsuperoxydzusatz zuerst einen gelben Niederschlag, der sich sehr bald blau färbt; auf Alkoholzusatz tritt wieder Gelbfärbung auf. (Gewöhnliche Benzidinreaktion auf Blut: durch Zusatz von Alkohol im Überschuß wird die Blaufärbung ebenfalls in Gelb verwandelt.) Die Blaufärbung könnte auch auf einer Oxydation des K_4FeCy_6 durch H_2O_2 beruhen, unter Bildung von Berlinerblau. (Berlinerblau wird durch Alkohol ebenfalls entfärbt.) Verdünntes Ferrocyankalium zeigt auf H_2O_2-Zusatz eine deutlich grüngelbe Färbung, ein Hinweis auf die Bildung von Ferricyankalium, welches die Benzidinreaktion gibt.

Die Benzidinproben geben uns zugleich die Möglichkeit, eine Bestätigung zu suchen, für die schon oben nachgewiesenen Unterschiede der *verschiedenen Ferrikomplexverbindungen.* Im Gegensatz zum Ferricyankalium gibt komplexes Ferricitrat die Benzidinreaktion nicht, ebenso auch nicht das komplexe Ferrirhodanid.

Ein Tropfen verdünntes Ferrichlorid + H_2O + Alkohol. Benzidin gibt Blaufärbung.

Ein Tropfen verdünntes $FeCl_3$ + Natriumcitrat + Alkohol. Benzidin bleibt farblos (bzw. leicht gelblich vom Ferricitrat) + Wasserstoffsuperoxyd: keine Blaufärbung.

Wenn man aber in eine Mischung von komplexem Natriumferrirhodanid und Benzidin Eisen hinzufügt, so ist die Affinität des Benzidin für das Eisen stark genug, um von der Bindung an das überschüssige Rhodanid abzulenken.

Ein Überschuß von NaCNS wird tropfenweise mit ganz verdünnter Ferrichloridlösung versetzt. Es entsteht beim Eintropfen eine Rotfärbung, die gleich wieder verschwindet. Diese farblose Lösung gibt die Benzidinprobe nicht. Versetzt man sie weiter mit einem Tropfen Ferrichlorid, so tritt Blaufärbung auf, diese rührt aber vom Ferrichlorid her, denn eine Vergleichsprobe, bei der das Benzidin erst zuletzt hinzugegeben wird, bleibt farblos.

Ein besonderes Interesse verdienen noch die Versuche über die Beeinflussung der Benzidinprobe durch Hydroxylamin, da dieses keine Benzidin-Reaktion gibt, also eine Entscheidung der Frage ermöglicht, ob Methaemoglobin diese Reaktion gibt.

Durch salzsaures Hydroxylamin hervorgerufenes Methaemoglobin gibt bei Überschuß von Hydroxylamin und leicht ammoniakalischer Reaktion mit Benzidin und H_2O_2 keine Blaufärbung.

Blut + Hydroxylamin im Überschuß + Natr. acetat im Überschuß + Benzidin + Wasserstoffsuperoxyd gibt schwach blauviolette Färbung, die aber bald wieder verschwindet, wobei sich Gas entwickelt.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß das Methaemoglobin die Benzidinreaktion wenn überhaupt, nur sehr schwach gibt. Wir sehen dies auch bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd. Dies ist eine klare Bestätigung dafür, daß das Methaemoglobin kein geeigneter Sauerstoffüberträger ist, ganz in Übereinstimmung mit seinem physiologischen Verhalten.

Literaturverzeichnis.

V. Balthazard et M. Philippe, La Méthémoglobine contient plus d'oxygène que l'oxyhémoglobine. Comptes rendus d. séances de la société. de Biologie *93,* p. 998 (1925).

V. Balthazard et M. Nicloux, A propos de la teneur en oxygène de la Méthémoglobine. idid. *93,* p. 991.

E. E. Butterfield, Lichtextinktion, Gasbindungsvermögen u. Eisengehalt des Blutfarbstoffes. Zeitsch. f. physiol. Ch. *62,* 173 (1909).

J. B. Conant, An electrochemical study of Hemoglobine. Journal of Biological Chemistry *57,* 401 (1923).

A. Dittrich, Über methaemoglobinbildende Stoffe. Archiv f. exp. Patholog. und Pharmakol. *29,* 247 (1891).

J. Donald van Slyke and E. Vollmund, Journal of Biological Chemistry *66,* 415 (1925).

Ellinger, Ph., Über den Mechanismus der Methaemoglobinbildung durch Acetanilid. Zeitschr. f. physiol. Chemie *111,* 86 (1920).

Ellinger, Ph. und F. Rost, Über die Methaemoglobinbildung d. Narkotica. Archiv f. exper. Path. und Pharmac. *95,* 281 (1922).

R. M. Ferry, A methode for the study of the equilibry between Oxyhemoglobine and methemoglobine. Journal of biological Chemistry *57,* 819 (1923) und *59,* 295 (1924).

H. Fischer und K. Schneller, Beitrag zur Kenntnis des Blutfarbstoffes. Zeitschr. für physiol. Chemie *128,* 231 (1924).

J. B. S. Haldane, Journal of Physiolog. *27,* 174 (1897), *22,* 298 (1898), *25,* 295 (1900).

F. Haurowitz, Zur Kenntnis des Methaemoglobins und seiner Derivate. Zeitschr. f. physiol. Chemie *138,* 68 (1923).

W. Heubner und Mitarbeiter, Studien über Methaemoglobinbildung. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. *100,* 117 u. 149 (1923), *96,* XXX.

— *70,* 71 (1912), *72,* 241 (1913), *73,* 239 (1913).

— Zentralbl. f. Gewerbehygiene *2,* 409 (1914).

— Zeitschr. f. phys. Chemie *109,* 189 (1920).

Holden Henry Fr., A note on the presence of glutathione in the corpuscules etc. Biochem. Journal *19,* 727.

Hoppe-Seyler, Zentralblatt der Med. Wissensch. 1864, S. 834. Zeitschr. f. Phys. Chemie *2,* 141, *6,* 166. Archiv f. (Anat.) u.) Physiol. 1904, Suppl. 391.

Hüfner, G. und Mitarbeiter, Über den Sauerstoffgehalt des Methaemoglobins. Zeitschr. f. Physiol. Chemie 7, 366.

— Archiv f. (Anat. u.) Phys. *39,* 1900 und 1907, S. 209.

W. Küster, Beiträge der Chemie des Blutfarbstoffes. Zeitschr. f. physiol. Chemie *66,* 165 (1910).

— Über die Bindung des Eisens in der prosthet. Gruppe d. Blutfarbst. Zeitschr .f. physiol. Chemie *109,* 108—117 (1920), *110,* 93 (1920), *121,* 121 (1922). Ber. der deutsch. chem. Ges. *43,* 370 (1910).

E. Letsche, Über die Einwirkung von Hydroxylamin auf den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chemie *80,* 412 (1912). Beiträge zur Kenntnis des Blutfarbstoffs. ibid. *76,* 243 (19).

W. Lipschitz, Mechanismus der Giftwirkung aromat. Nitroverb. usw. Zeitschr. f. physiol. Chemie *109,* 189 (1920).

— Über den Wirkungsmechanismus von Blutgiften. Ergebnisse der Physiologie 23, 10 (1924).

— i. Ergebnisse der Physiologie (Handbuch v. Asher u. Spiro) (1924).

— *und J. Weber,* Über Methaemoglobinbildung. Zeitschr. f. physiol. Chemie *132,* 250 (1923).

W. Manchot, Über die Wertigkeit des Metalles in den Blutfarbstoffen und die Best. ihres Gasbindungsvermögens. Zeitschr. f. physiol. Chemie *70,* 231 (1910).

— i. Liebigs Annalen *350,* 368 u. *370,* 241 (1909).

J. Markwalder, Zur Kenntnis der Thermen von Baden. Schweiz. med. Wochenschr. 1924/25.

P. Masoin, Contributions à l'étude des substances méthémoglobinisantes. Archive intern. de Pharmacodynam. *5,* 307 (1899).

R. Meier, Studien über Haemoglobinbildung. Arch. f. exp. Path. u. Pharmacol. *100,* VIII und *110,* 241 (1926).

— Methaemoglobinbildung und katalyt. Wirkung des Blutfarbstoffs. Klin. Wochenschr. 1925, S. 2261.

H. J. Morgans u. J. M. Neill, Methaemoglobinbildung durch sterile Kult. infiltr. v. Pneumococc. (Ref.: Zentralbl. Ch. B. IV. 1933 (1924). Journ. of exp. Med. 40, 269.

M. Nicloux et J. Foutès, Darstellung u. Bestimmung des Methb. Comptes rendus des séances de l'Academ. des Sciences *178,* 1757.

— *et Roche,* Studie über die Reakt. v. K_3FeCy_6 auf Haemoglo-

bin etc. Compt. rend. des séances de la société. de Biologie *93,* 1373 (1925).

Nicloux et Roche, Sur la teneur en oxygène de la méthémogl. etc. Comptes rendus des séances de la société. de Biologie *93,* 275 (1925) und 1659: Sensibilt. de MHb et OxyHb à un réducteur.

— Sur la teneur de la Méthémoglobine en Oxygène. Compt. rendus des séances de l'Acad. des sciences *180,* 1965 (1925). Bull. Soc. Chim. Biol. *8,* 71 (1926).

G. Quagliariello, Sul contento in ossigeno della metemoglobina. Archivio delle Scienze biologiche *5,* 193 (1923).

— La riduzione della metemogl. etc. ibidem. *3,* 308 (1922).

— Sul spettro d'assorbat. della metemogl. *3,* 65 (1922).

B. v. Reinbold, Beiträge zur Kenntnis des Methaemoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chemie *85,* 250 (1913).

J. Roche, Sur la methémoglobinisation. L'action de l'Hydroxylamin etc. Comptes rendus des séances de la société de Biologie *93,* 1377 (1925).

— Bulletin d. Chim. Biol. *8,* 98 (1926).

K. Sakurai, Über die Rückbildung des Methaemoglobins. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. I. Mittlg. *107,* 287, II. Mittlg. *109,* 198.

v. Zeynek, Neue Beobachtungen und Versuche über das Methaemoglobin und seine Bildungsweise. Arch. Anat. u. Physiol. (1899), 460, Bd. 23. Zeitschr. f. physiol. Chemie *130,* 242 (1923).